

T/GXAS

团 体 标 准

T/GXAS 1112—2025

基因编辑 C57BL 小鼠雄原核显微注射 操作技术规程

Technical code of practice for pronuclear microinjection in
gene-editing C57BL mice

2025 – 10 – 09 发布

2025 – 10 – 14 实施

广西标准化协会 发 布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 缩略语 1

5 基本要求 1

6 技术流程 1

7 技术操作 1

 7.1 实验准备 1

 7.2 注射盘制备 2

 7.3 显微固定针调整 2

 7.4 显微注射针上样 2

 7.5 显微注射针安装 2

 7.6 微量自动注射仪设置 2

 7.7 分子样品注射 2

8 档案管理 3

附录 A（资料性） 培养液成分 4

附录 B（资料性） 注射前后受精卵状态 5

 B.1 注射前状态 5

 B.2 注射成功状态 5

 B.3 注射失败状态 6

附录 C（资料性） 小鼠雄原核显微注射操作记录 7

前 言

本文件参照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广西医科大学提出和宣贯。

本文件由广西标准化协会归口。

本文件起草单位：广西医科大学、中山大学实验动物中心、南京医科大学医药实验动物中心、重庆医科大学实验动物中心、郑州大学实验动物中心、广州中医药大学动物实验中心、右江民族医学院、广西卓强科技有限公司、广西华仁济瀛生物科技有限公司。

本文件主要起草人：何敏、张俊、孙俊铭、欧阳轶强、杨丽超、申聪慧、曾文滔、张倩、杜春燕、石晓静、张永斌、宋亚威、潘斌、段增强、曾勇。

基因编辑 C57BL 小鼠雄原核显微注射 操作技术规程

1 范围

本文件确立了基因编辑C57BL小鼠（以下简称“小鼠”）雄原核显微注射操作的程序，规定了基本要求及技术操作的指示，描述了操作过程信息的追溯方法。
本文件适用于小鼠雄原核显微注射操作。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 35823 实验动物 动物实验通用要求

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

KSOM: KSOM培养液 (KSOM medium)

M2: M2培养液 (M2 medium)

5 基本要求

操作过程的机构和人员符合GB/T 35823的要求，整个操作在无菌条件下进行。

6 技术流程

见图1。

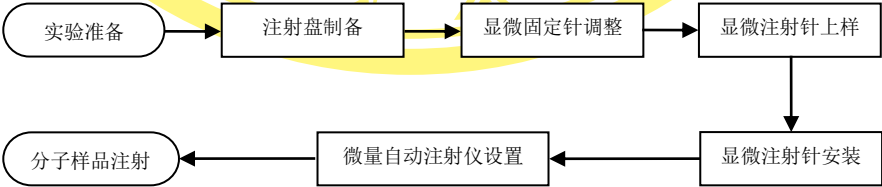


图1 小鼠雄原核显微注射操作技术流程

7 技术操作

7.1 实验准备

7.1.1 材料与试剂

准备以下材料和试剂，M2和KSOM成分见附录A：

- 注射针：外径 $0.8\ \mu\text{m}$ ~ $1\ \mu\text{m}$ ；
- 固定针：外径 $30\ \mu\text{m}$ 、内径 $15\ \mu\text{m}$ ；
- 细胞培养皿：60 mm；
- 微量离心管；
- M2；
- KSOM；
- 胰蛋白酶：质量分数 0.25%；
- 组织培养矿物油；
- 小鼠受精卵；
- 基因编辑分子样品。

7.1.2 仪器设备

准备以下仪器设备：

- 显微操作系统；
- 体视显微镜；
- 超净工作台；
- CO₂ 培养箱；
- 移液枪；
- 微量自动注射仪。

注：微量自动注射仪所用型号为 FemtoJet 4i，也可采用能达到相同注射效果的其他型号微量自动注射仪。

7.2 注射盘制备

7.2.1 准备 2 个无菌的 60 mm 细胞培养皿，用移液枪在每个培养皿中心滴入 3~6 滴（每滴为 $30\ \mu\text{L}$ ）M2，并覆盖上 6 mL~8 mL 矿物油，制作成 M2 注射盘，其中一个作为备用。

7.2.2 将制作的注射盘，放入温度为 37 °C、CO₂ 浓度为 5%、湿度饱和的培养箱平衡 1 h 以上。

7.3 显微固定针调整

7.3.1 将固定针安装至左侧持针仪并夹紧，缓慢调整气泵压力，直到固定针尖位置的空气流左右稳定摆动。

7.3.2 在操作平台上放置装有 M2 的培养皿，将固定针降低至 M2 中清洗后，调整固定针针口位于显微镜视野中央。

7.4 显微注射针上样

将-80 °C 保存的基因编辑分子样品（以下简称“分子样品”）提前解冻，常温下完全融化后置于冰上，用移液枪将不同的分子样品按照比例依次加入无菌的微量离心管中充分混合，小心并迅速移入灭菌后的注射针中。

7.5 显微注射针安装

将装好分子样品的注射针安装至右侧持针仪夹紧，连接微量自动注射仪，同步调整注射针与固定针的水平倾斜角度到 30°~45°，固定针开口和注射针针尖距离为 2 个受精卵直径且水平对齐。

7.6 微量自动注射仪设置

注射前打开微量自动注射仪，进行自动操作程序，仪器提示稳定后，设置仪器注射压力为 500 hPa、脉冲时间为 3 μs 、补偿压力为 10 hPa。

7.7 分子样品注射

7.7.1 将注射盘的液滴调整到显微镜视野中央位置，吸取准备好的受精卵并移入注射盘液滴中，分别将固定针和注射针降低到靠近受精卵的高度。

7.7.2 反向旋转固定针气泵，吸取并固定单个受精卵，用注射针拨动受精卵以调整方位，将雄原核置于显微镜视野中央。

7.7.3 保持注射针与固定针的水平倾斜角度在 $30^{\circ} \sim 45^{\circ}$ ，注射针针尖刚好抵近受精卵球体的横切面，使雄原核与注射针针尖的距离最小。

7.7.4 轻柔的将注射针推入受精卵中，依次刺破透明带、质膜和雄原核核膜，时间控制在 $1\text{s} \sim 2\text{s}$ 内。若无法穿透质膜，则调整受精卵位置再次进针。

7.7.5 将分子样品注射入雄原核中，雄原核体积膨胀 1 倍时，迅速拔出注射针，直至完全离开受精卵。注射前受精卵正常状态见附录 B 图 B.1。

7.7.6 注射完成后，若受精卵状态正常（见附录 B 图 B.2），则初步判定显微注射成功；若受精卵出现胞质外流或萎缩等细胞死亡现象（见附录 B 图 B.3），则判定显微注射失败。

8 档案管理

记录操作过程的实验室环境参数、设备参数、注射数量及成功率、操作人员等信息，资料归档并保存不少于5年。记录表见附录C。



附 录 A
(资料性)
培养液成分

培养液成分见表A. 1和表A. 2。

表A. 1 M2 成分表

成分	含量/ (g/L)
二水合氯化钙	0. 25137
硫酸镁 (无水)	0. 1649
氯化钾	0. 35635
磷酸二氢钾	0. 162
碳酸氢钠	0. 35
氯化钠	5. 53193
牛血清白蛋白 (第五组份)	4. 0
葡萄糖	1. 0
N-2-羟基乙基哌嗪-N'-2-乙烷磺酸钠	5. 42726
水溶性酚红钠盐	0. 0106
丙酮酸钠	0. 0363
DL-乳酸钠	2. 95

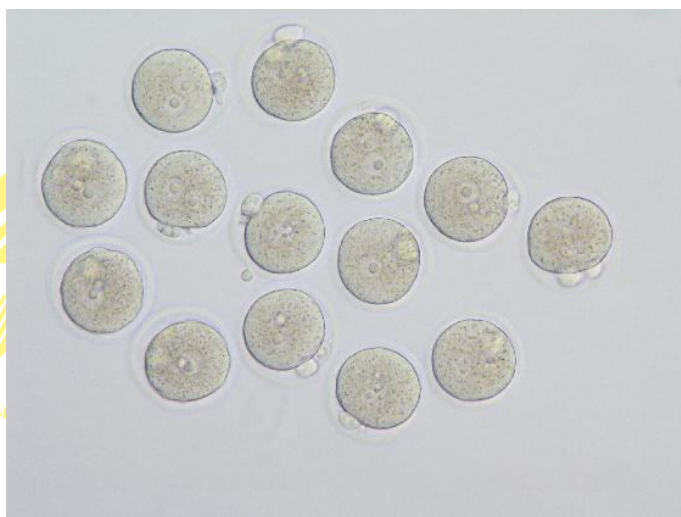
表A. 2 KSOM 成分表

成分	含量
氯化钠/ (mMol/L)	95. 00
氯化钾/ (mMol/L)	2. 50
磷酸二氢钾/ (mMol/L)	0. 35
七水合硫酸镁/ (mMol/L)	0. 20
葡萄糖/ (mMol/L)	0. 20
庆大霉素硫酸盐/ (g/L)	0. 025
乳酸钠/ (mMol/L)	10. 00
碳酸氢钠/ (mMol/L)	25. 00
酚红/ (g/L)	0. 001
丙酮酸钠/ (mMol/L)	0. 20
二水合氯化钙/ (mMol/L)	1. 71
乙二胺四乙酸二钠/ (mMol/L)	0. 01
L-谷氨酰胺/ (mMol/L)	1. 00
牛血清白蛋白/ (g/L)	1. 00

附 录 B
(资料性)
注射前后受精卵状态

B.1 注射前状态

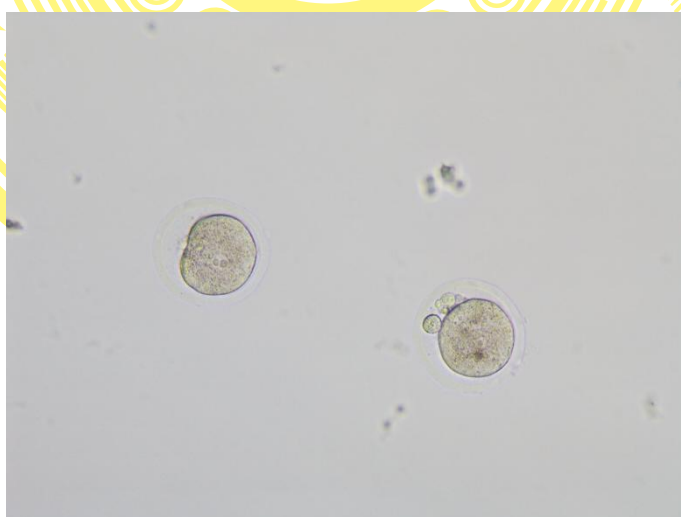
见图B.1。



图B.1 注射前受精卵正常状态

B.2 注射成功状态

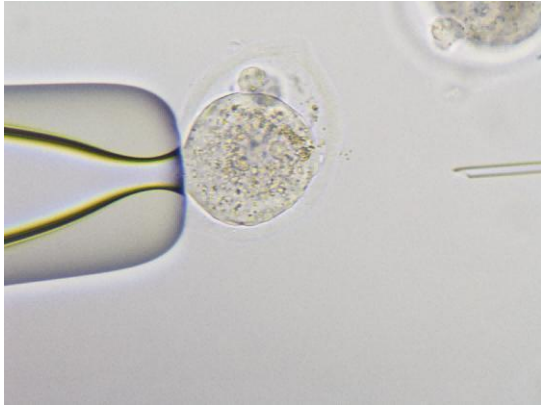
见图B.2。



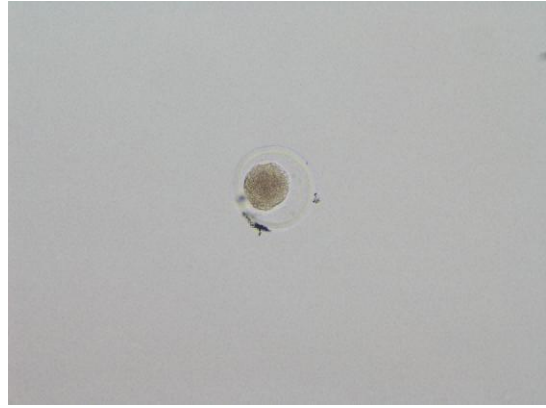
图B.2 注射成功受精卵状态

B.3 注射失败状态

见图B.3。



a) 胞质外流



b) 胞质萎缩

图B.3 注射失败受精卵状态

附 录 C
(资料性)
小鼠雄原核显微注射操作记录

小鼠雄原核显微注射操作记录信息见表C.1。

表C.1 小鼠雄原核显微注射操作记录

记录人：_____ 审核人：_____ 实验室环境：_____

日期	注射数量	注射成功数量	注射参数	操作人员	备注



中华人民共和国团体标准
基因编辑C57BL小鼠雄原核显微注射操作技术规程
T/GXAS 1112—2025
广西标准化协会统一印制
版权专有 侵权必究